Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern

(Direktor: Prof. Dr. C. Hallauer)

Über die Wirkung von Chlorophyll auf Bakterien, insbesondere haemoglobinophile Bacillen

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

OSKAR HARNISCH

Schwarzenburg
Bern

Gerber-Buchdruck, Schwarzenburg, 1942

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern

(Direktor: Prof. Dr. C. Hallauer)

Über die Wirkung von Chlorophyll auf Bakterien, insbesondere haemoglobinophile Bacillen

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

OSKAR HARNISCH

Schwarzenburg
Bern

Gerber-Buchdruck, Schwarzenburg, 1942

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. C. Hallauer von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 6. Mai 1942.

Der Dekan der
medizinischen Fakultät:

Muralt.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Seit den zahlreichen Experimentalarbeiten von E. Bürgi[1]) und seinen Mitarbeitern ist die zellstimulierende und gewebstonisierende Wirkung von Chlorophyll auf tierische und menschliche Zellen, Gewebe und Organe weitgehend erforscht und bekannt. Ueber die Wirkung des Chlorophylls auf einzellige, primitive pflanzliche Mikroorganismen wie die chlorophyllfreien Schizomyceten liegen dagegen nur spärliche Angaben vor. So scheint aus einer neuern Arbeit von Gruskin[2]) hervorzugehen, daß das Chlorophyll gegenüber einer größern Anzahl von Infektionserregern einen leichten bakteriostatischen Effekt ausübt. Fernerhin stellten Daly, Heller und Schneider[3]) sowie Henderson und Long[4]) fest, daß Chlorophyllderivate (Chlorophyllin-a, Chlorin-e, Rhodin-g, Pyrroporphyrin und Deuteroporphyrin) das Wachstum von Tuberkelbacillen in der Kultur deutlich zu hemmen vermögen. Schließlich fand Olsen[5]) schon vor Jahren, daß der Blutfarbstoff (Haemoglobin, Haematin bzw. Haemin) durch Chorophyll als X-Faktor bei der Züchtung von haemoglobinophilen Bakterien (B.influenzae Pfeiffer) nicht ersetzt werden kann. Unter diesen Umständen erschien eine systematische Bearbeitung dieser Frage angezeigt.

Experimenteller Teil.

I. Keimwidrige Eigenschaften des Chlorophylls.

Ausgehend von den Befunden von Gruskin wurde zunächst untersucht, ob dem Chlorophyll bactericide bzw. entwicklungshemmende Eigenschaften zukommen.

Die **Keimtötungsversuche** wurden nach der folgenden Versuchstechnik durchgeführt:

Als Chlorophyllpräparat wurde das wasserlösliche Chlorophyllinnatrium*) in 2 bzw. 10% Lösung in Aq. dest. verwendet. Die alkalische Reaktion dieser Chlorophyllösungen (2%-Lösung: pH 8,0; 10%-Lösung: pH 8,6) erwies sich, wie in Kontrollversuchen mit Aq. dest. (ohne Chlorophyll) desselben pH nachgewiesen werden konnte, für den Ausfall der Keimtötungsversuche als irrelevant, da sämtliche der verwendeten Keime durch eine solche Alkalinität während der eingehaltenen Versuchsdauer nicht geschädigt wurden.

Die Versuchsanordnung bestand darin, daß je 2 Tropfen einer 24stündigen Kultur verschiedener Testkeime (Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Pneumococcus, Coli-, Milzbrandbacillen) zu je 5 cc der Chlorophyll-Lösung, die im einen Fall bei Zimmertemperatur, im andern bei 37° C gehalten wurde, zugesetzt wurde. Die Abimpfung erfolgte nach 1, 3, 4, 7, 18, 24, 48 und 72 Stunden auf Nährbouillon, Schrägagar und Blutplatte.

*) Das Präparat wurde uns von Herrn Prof. E. Bürgi freundlichst überlassen.

Die erzielten Versuchsergebnisse sind in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I. Bactericide Wirkung von Chlorophyll.

Keime:	Chlorophyll 2%		Chlorophyll 10%	
	Abtötungszeit		Abtötungszeit	
	16 — 18° C.	37° C.	16 — 18° C.	37° C.
Staphylococcus aureus haem.	> 72 St.	> 72 St.	> 72 St.*)	> 72 St.*)
Streptococcus haem.	24 — 72 St.	24 — 48 St.	24 — 48 St.	24 St.
Pneumococcus (Gruppe X)	7 — 48 St.	./.	./.	./.
Enterococcen	24 — 72 St.	./.	24 — 72 St.	./.
Colibacillen	> 72 St.	> 72 St.	> 72 St.	> 72 St.
Milzbrandbacillen Vegetat. Formen	18 St.	./.	3 St.	./.
Sporen	./.	> 8 Tage	./.	> 8 Tage

*) Keimverminderung

Schon eine flüchtige Betrachtung von Tab. I läßt erkennen, daß dem Chlorophyll nur eine geringfügige bactericide Kraft zukommt. Sporen von Milzbrandbakterien wurden — erwartungsgemäß — von Chlorophyll überhaupt nicht geschädigt, resistentere vegetative Keime, wie Staphylococcen und Colibacillen wurden bei einer 72stündigen Chlorophylleinwirkung kaum oder nicht beeinflußt, labilere Keime, wie Strepto- und Enterococcen wurden erst nach 24—72 Stunden abgetötet, und nur bei den gegen Umweltseinflüsse so hinfälligen Pneumococcen und bemerkenswerterweise auch bei jungen, noch nicht versporten Kul-

turen von Milzbrandbacillen wurde ein bactericider Effekt schon innerhalb der ersten 24 Stunden erzielt.

Von Interesse ist, daß — bei resistenteren Keimen — weder die Steigerung der Chlorophyllkonzentration von 2% auf 10% noch die Erhöhung der Einwirkungstemperatur einen wesentlichen Einfluß auf die Abtötungszeit hatte, ein Befund, der die Annahme nahelegt, daß das Chlorophyll nicht nach Art gewisser chemischer Desinfektionsmittel (z. B. Phenol), deren Wirksamkeit von der Konzentration und der Temperatur bekanntlich in hohem Grade abhängig ist, einwirkt.

Bei den **Entwicklungshemmungsversuchen** wurde Chlorophyllin-Natrium in wechselnden Konzentrationen den Nährböden zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, daß sämtliche Nährböden denselben pH von 7,2 bis 7,3 aufwiesen. Beimpft wurden die Nährböden mit je 1 Oese einer 24stündigen flüssigen Kultur oder mit hinreichend verdünnten Abschwemmungen von festen Kulturen der verschiedenartigsten Testkeime. Die Entwicklungshemmung wurde bei den Versuchen auf flüssigen Nährböden (Bouillon bzw. Eier- oder Leberbouillon) nicht nur durch die Feststellung des ausgebliebenen oder verminderten Keimwachstums, sondern auch durch die Ueberimpfung der Kulturen nach bestimmten zeitlichen Intervallen (4, 7, 24 und 48 Stunden) auf feste Nährböden (Blutagarplatte) beurteilt. In den Versuchen auf festen Nährböden (Nähragar) wurde die Entwicklungshemmung durch die Stärke des Keimwachstums bzw. durch die Auszählung der Kolonien abgeschätzt.

Tab. II gibt zunächst Auskunft über den Versuchsausfall bei Verwendung von flüssigen Nährböden und haemolytischen Streptococcen als Testkeime.

Tabelle II. Entwicklungshemmungsversuch mit haemolytischen Streptococcen in Eierbouillon.

Chlorophyllgehalt:	Wachstum auf Blutagar bei Ueberimpfung nach:			
	4 St.	7 St.	24 St.	48 St.
3%	—	—	—	—
1%	—	—	—	—
$^1/_3$%	—	—	—	+
$^1/_9$%	1 Kol.	+	+	++
$^1/_{27}$%	1 Kol.	++	+++	+++
$^1/_{81}$%	4 Kol.	+++	+++	+++
0% (Kontrolle) .	8 Kol.	+++	+++	+++

Legende: + = 20 — 100 Kolonien
+++ = > 1000 Kolonien bezw. rasenförmiges Wachstum

Haemolytische Streptococcen wurden demnach bereits in einer Chlorophyllkonzentration 1 : 900 deutlich in ihrer Entwicklung gehemmt, bei höherer Chlorophyllkonzentration (1 : 300) war die Hemmung des Keimwachstums innerhalb der ersten 24 Stunden vollständig und bei einem noch größeren Chlorophyllgehalt (1 : 100 und 1 : 33) wurde überhaupt jegliche Keimvermehrung — innerhalb der Beobachtungszeit von 48 Stunden — unterdrückt.

Eine derartige beachtlich starke bakteriostatische Wirkung von Chlorophyll ließ sich aber zunächst nur gegenüber haemolytischen Streptococcen nachweisen; Staphylococcen und Colibacillen, die in derselben Versuchsanordnung geprüft wurden, verhielten sich gegenüber Chlorophyll völlig refraktär, d. h. zeigten auch in Nährböden von 3% Chlorophyllgehalt ungehemmtes Keimwachstum. Zwei in Leberbouillon geprüfte anaerobe Sporenbildner (B.per-

fringens, B.putrificus) vermochten auch bei hohen Chlorophyllkonzentrationen (2%) zu gedeihen und ausgiebig Gas zu bilden. Das Wachstum von B.perfringens wurde hierbei durch Chlorophyll anscheinend nicht im geringsten behindert, während die Entwicklung von B.putrificus bei höhern Chlorophyllkonzentrationen (0,1—2%) zwar nicht unterdrückt, aber doch deutlich gehemmt war.

Die entwicklungshemmende Eigenschaft von Chlorophyll gegenüber einer größern Anzahl von Testkeimen wurde auf festen Nährböden (Nähragar) geprüft. Als Testkeime wurden gramnegative und grampositive Coccen bzw. Bacillen und aerob bzw. anaerob sporulierende Stäbchen verwendet. Sämtliche Keime — auch die anspruchsvolleren Brucellen und Meningococcen — wuchsen (mit Ausnahme der Influenzabacillen) auf gewöhnlichem Nähragar bzw. Traubenzuckerhochagar. Die in mehreren Versuchen erzielten Resultate sind in Tab. III wiedergegeben.

Die bakteriostatische Wirkung von Chlorophyll war demnach auf festen Nährböden noch ausgeprägter wie auf flüssigen. Chlorophyllkonzentrationen von 1 : 5000 bis 1 : 10 000 bzw. ein Chlorophyllgehalt von 0,02—0,01% vermochten bereits die Entwicklung von Strepto-, Entero-, Pneumo- und Meningococcen sowie von Diphtherie- und Bangbacillen vollständig zu verhindern. Eine bemerkenswerte Empfindlichkeit gegen Chlorophyll zeigten auch die geprüften aeroben Sporenbildner (Milzbrand- und Erdbacillen) sowie auch der anaerob sporulierende B.putrificus; alle diese Keime zeigten schon bei einem Chlorophyllgehalt von 0,2% kein Wachstum mehr. Völlig unbeeinflußt blieben demgegenüber — außer den bereits als chlorophyllresistent erkannten Staphylococcen — sämtliche intestinalen Infektionserreger (Typhus-, Paratyphus-, Dysenteriebacillen) und vor allem auch der anaerobe Sporenbildner B.perfringens.

Tabelle III. Entwicklungshemmung auf Chlorophyllagar.

Chlorophyllgehalt	0,2 %	0,05 %	0,02 %	0,01 %	0,0025 %	0,001 %	0,00025 %
Staphylococcen . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
häm. Streptococcen	−	−	−	+	++	++	++
Enterococcen . . .	−	−	−	+	++	++	++
Pneumococcen (Typ I)	−	−	−	+	++	++	++
Meningococcen (St. 1)	−	−	−	−	++	++	++
Meningococcen (St. 2)	−	−	−	±	+++	+++	+++
Meningococcen (St. 3)	−	−	−	+	++	+++	+++
Typhusbacillen . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Schottmüllerbacillen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dysenteriebacillen (E)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
» (Flexner)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Diphtheriebac. (St. 1)	−	−	−	−	++	++	++
Diphtheriebac. (St. 2)	−	−	−	+	++	++	++
Diphtheriebac. (St. 3)	−	−	−	−	++	++	++
Bangbacillen . . .	−	−	−	−	+	+	+
Influenzabacillen .	−	−	−	−	−	−	−
Milzbrandbacillen .	−	+	++	+++	+++	+++	+++
aerob sporul. Erdbac.	−	+	+++	+++	+++	+++	+++
B.perfringens . . .	++	++	++	++	++	++	++
B.putrificus	−	+	++	++	++	++	++

+++ = reichliches Wachstum
++ = mittleres Wachstum
+ = geringes Wachstum

Weder die Zugehörigkeit zu den Coccen bzw. Bacillen, das Verhalten gegenüber der Gramfärbung, die aerobe bzw. anaerobe Lebensweise, noch das Vermögen zur Sporulation waren demnach für die Empfindlichkeit bzw. Resistenz eines Keimes gegenüber Chlorophyll von maßgeblicher Bedeutung. Aus der vorstehenden Tabelle scheint vielmehr hervorzugehen, daß vor allem diejenigen Keime, die gegenüber schädigenden Milieueinflüssen besonders labil sind und die an ihre Nährböden besondere Ansprüche stellen und daher auf gewöhnlichen Substraten nicht optimal gedeihen, der entwicklungshemmenden Wirkung von Chlorophyll in hohem Grade unterliegen. Daß auch Sporenbildner durch Chlorophyll in ihrer Entwicklung gehemmt werden, ist nicht besonders auffallend, da die vegetativen Formen dieser Keime gegen Umweltseinflüsse keineswegs besonders widerstandsfähig und die Sporen zwar gegen Chlorophyll resistent sind, aber — wie ein ad hoc angestellter Versuch ergab — in Nährböden von höherem Chlorophyllgehalt nicht auszukeimen vermögen.

Schließlich geht aus dieser Versuchsreihe bereits auch hervor, daß das für die Entwicklung von Influenzabacillen unentbehrliche Haemoglobin bzw. Haematin durch Chlorophyll nicht ersetzt werden kann.

Der Mechanismus der bakteriziden bzw. bakteriostatischen Wirkung von Chlorophyll konnte trotz zahlreicher, in dieser Richtung angestellter Versuche nicht aufgeklärt werden. Aus den Keimabtötungsversuchen schien lediglich mit einiger Wahrscheinlichkeit hervorzugehen, daß das Chlorophyll nicht nach der Art gewöhnlicher chemischer Desinfektionsmittel einwirkt.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die Chlorophyllwirkung auf einem photodynamischen Effekt beruht, wurde eine größere Serie von Versuchen durch-

geführt, in denen Keimabtötungs- und Entwicklungshemmungsversuche nicht nur im Dunkeln, sondern auch im diffusen Tageslicht, im direkten Sonnenlicht bzw. bei gleichzeitiger Bestrahlung mit der künstlichen Höhensonne vorgenommen wurden. Alle diese Versuche fielen insofern völlig negativ aus, als es in keinem Fall gelang, die keimtötende Wirkung des Lichtes bzw. der U.V.-Strahlung durch Chlorophyll zu verstärken. In höheren Konzentrationen vermochte das Chlorophyll im Gegenteil die keimschädigende Wirkung der Bestrahlung aufzuheben, ein Effekt, der zweifellos auf die Adsorption von Lichtstrahlen kleiner Wellenlänge durch den grünen Chlorophyllfarbstoff bewirkt wird.

Von größerem Interesse war dagegen die Beobachtung, daß die entwicklungshemmende Wirkung von Chlorophyll auf bluthaltigen Nährböden weitgehend aufgehoben wird (vgl. Tab. IV, Versuchsserie A und B); derselbe Effekt wurde erzielt, wenn dem Nähragar an Stelle von Vollblut Haemoglobin (aus Pferdeblut kristallisiert) zugesetzt wurde (vgl. Versuchsserie C). Die Vermutung, daß der Blutfarbstoff selbst eine antagonistische Wirkung auf Chlorophyll ausübt, wurde jedoch durch Versuche, in denen das Haemoglobin durch das eiweißfreie Haematin bzw. Haemin ersetzt wurde, widerlegt, indem es in diesem Fall nicht mehr gelang, die durch Chlorophyll bedingte Entwicklungshemmung auszuschalten (vgl. Versuchsserie D). Da andererseits auch der Zusatz von Rinderserum bzw. Ascitesflüssigkeit den bakteriostatischen Effekt von Chlorophyll ebenso hemmte wie Vollblut und Haemoglobin (vgl. Versuchsserie E und F), war erwiesen, daß die beobachtete Schutzwirkung durch die Gegenwart von Eiweißstoffen bedingt ist. Eiweißhaltige Medien beeinträchtigen nun bekanntlich auch die Wirksamkeit zahlreicher anderer Desinfektionsmittel, so

Tabelle IV. Entwicklungshemmu

Nährböden	A Agar					
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,2
Streptococcen	+++	–	–	–	–	–
Pneumococcen	+++	–	–	–	–	–
Diphtheriebacillen	++	–	–	–	–	–
Milzbrandbacillen	+++	+++	+++	++	++	–
M-Sporen	+++	+++	+++	++	+	–
B.putrificus	++	++	++	++	+	–
Nährböden	**C Agar + Haemoglobin**					
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,2
Streptococcen	+++	+++	+++	+++	+++	++
Pneumococcen	+++	+++	+++	++	+	+
Diphtheriebacillen	++	++	++	++	++	+
Milzbrandbacillen	+++	+++	+++	+++	+++	++
M-Sporen	+++	+++	+++	+++	+++	+
Nährböden	**E Agar + Serum**					
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,2
Streptococcen	+++	+++	+++	+++	++	+
Pneumococcen	+++	+++	+++	+++	++	+
Diphtheriebacillen	++	++	++	++	++	+
Milzbrandbacillen	+++	+++	+++	+++	+++	++
M-Sporen	+++	+++	+++	+++	+++	++

+++ starkes Wachstum ++ = mittleres Wachstum + = spärliches Wachstu

f festen Nährböden.

		B Agar + Vollblut							
,5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,2	0,5	1,0
–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
–	–	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
–	–	++	++	++	++	++	+	+	+
–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
–	–	++	++	++	++	+	+	+	+

		D Agar + Haemin							
,5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,2	0,5	1,0
++	++	+++	(+)	–	–	–	–	–	–
+	–	++	–	–	–	–	–	–	–
+	+	++	–	–	–	–	–	–	–
++	++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–
+	(+)	+++	+++	+++	++	+	(+)	–	–

		F Agar + Ascites							
,5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,2	0,5	1,0
++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
++	+	+++	+++	+++	++	+	+	+	(+)
+	(+)	++	++	++	++	++	++	++	+
++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

-) = angedeutetes Wachstum – = kein Wachstum

daß sich auch aus diesem Befund keine bestimmteren Rückschlüsse auf den Mechanismus der bakteriostatischen Wirksamkeit von Chlorophyll ableiten ließen.

Dagegen ist auf Grund dieser Feststellung zu erwarten, daß dem Chlorophyll in vivo keine keimfeindliche Wirkung zukommt. Tatsächlich gelang es auch in keinem Fall, minimal mit Pneumococcen inficierte Mäuse durch eine noch so ausgiebige Vor- und Nachbehandlung mit Chlorophyll irgendwie prophylaktisch oder therapeutisch zu beeinflussen; sämtliche dieser Tiere erlagen der Infektion nach derselben Zeit wie die Kontrolltiere. Diese Versuche stehen auch in Einklang mit den Beobachtungen von S. Bürgi[6]), der im Kaninchenversuch an künstlich inficierten Wunden keine antiseptische Wirkung von Chlorophyll nachweisen konnte. Die anscheinend günstigen Erfolge, die demgegenüber Gruskin bei der Chlorophyllbehandlung von eitrigen Infektionsprozessen beim Menschen erzielte, bezieht S. Bürgi wohl mit Recht auf eine indirekte Wirkung durch Hebung des Allgemeinbefindens und Stärkung der Abwehrkräfte des Organismus.

II. Chlorophyll und haemoglobinophile Bakterien.

Wie Olsen[5]) erstmalig feststellte, vermag Chlorophyll den roten Blutfarbstoff (Haemoglobin, Haematin) als X-Faktor für die obligat haemoglobinophilen Bakterien nicht zu ersetzen. Man könnte hieraus folgern, daß die zwischen Blut- und Blattfarbstoff bestehende chemische Aehnlichkeit, die bekanntlich in den vier durch Kohlenstoffatome verketteten Pyrrolringen zum Ausdruck kommt, für den X-Faktor nicht maßgebend ist, sondern das beim Blutfarbstoff in den Viererpyrrolring eingebaute Eisen, das be-

kanntlich im Chlorophyll durch Magnesium ersetzt ist. Die Bedeutung des Eisens für den X-Faktor schien auch dadurch erwiesen, daß nur die eisenhaltigen Blutfarbstoffe (Haemoglobin, Methaemoglobin, Haematin, Chlorhaemin) als Wachstumsfaktoren für haemoglobinophile Keime geeignet sind, nicht dagegen das eisenfreie Haematoporphyrin oder das kupferhaltige Haemocyanin (Fildes[7]), Olsen[5])). Die Gültigkeit dieser Auffassung ist nun aber durch neuere Versuche von Lwoff[8]) ernstlich erschüttert worden. Lwoff leistete nämlich den Nachweis, daß auch dem eisenfreien und katalaseinaktiven Protoporphyrin die Eigenschaft des X-Faktors zukommt, so daß für den X-Faktor weder der Eisen- noch der Katalasegehalt von ausschlaggebender Bedeutung sein dürfte, sondern eben doch die Struktur der Porphyrine.

Entscheidend ist möglicherweise die Art bestimmter an den Pyrrolringen haftender Seitenketten. So ist zumindest auffallend, daß das als X-Faktor taugliche Protoporphyrin — ebenso wie das Haemin — am 1. und 2. Pyrrolring eine Vinylgruppe aufweist, während diese ungesättigte Seitenkette im Haemato- und Aethioporphyrin fehlt. Im Chlorophyll ist nun allerdings eine Vinylgruppe (in 2. Stellung) gleichfalls nachgewiesen, so daß — unter der Voraussetzung, daß dieser Gruppe wirklich entscheidende Bedeutung zukommt — nicht ohne weiteres einzusehen ist, weshalb haemoglobinophile Bakterien den Viererpyrrolring des Chlorophylls als X-Faktor nicht verwenden, d. h. — nach Lwoff — nicht zum Aufbau ihres respiratorischen Systemes gebrauchen können.

Es wurde daher die Möglichkeit erwogen, daß das Chlorophyll nur wegen seiner bakteriostatischen Wirkung, für die nur eine bestimmte Komponente des Chlorophyllmoleküls verantwortlich sein könnte, als Wachstumsfaktor

nicht in Betracht kommt. Die Richtigkeit dieser Hypothese war der experimentellen Prüfung zugänglich, da die entwicklungshemmende Wirkung von Chlorophyll durch den Zusatz von Vollblut, Haemoglobin und Eiweiß anderer Provenienz eliminiert werden konnte.

Die nachfolgenden Versuche sollten über die Wirkung von Chlorophyll auf das Wachstum von haemoglobinophilen Keimen Aufschluß geben.

Versuchstechnik: Als Nährböden wurden verwendet:

Agar ohne Zusatz
» + Vollblut
» + Haemoglobin
» + Haemin
» + Serum
» + Ascitesflüssigkeit.

Diese Nährböden erhielten im einen Fall noch einen Zusatz von V-Faktor, in Form von Bierhefeextrakt, der nach der Vorschrift von Rivers und Bayne-Jones[9]) hergestellt und in einer Menge von 0,5 cc pro Platte zugesetzt wurde.

Sämtliche Nährböden wurden mit abgestuften Mengen (0,005—1,0%) Chlorophyllinnatrium versetzt, wobei je eine Platte einer Nährbodenserie zur Kontrolle ohne jeden Chlorophyllzusatz blieb.

Als Testkeime dienten 3 typische Stämme (St. 1—3) von B.influenzae (Pfeiffer), deren Wachstum an das gleichzeitige Vorhandensein von X- und V-Faktor gebunden war, und außerdem 1 Stamm von B.parainfluenzae (Rivers), dessen Entwicklung schon durch den V-Faktor allein gewährleistet wurde.

Die Ablesung sämtlicher Versuche erfolgte nach 24 bzw. 48 Stunden, wobei nicht nur auf die Dichte des Keim-

wachstums, sondern auch auf die Größe der Koloniebildung geachtet wurde.

Ueber den Ausfall dieser Versuche gibt Tab. V Aufschluß.

Es konnte demnach — in Bestätigung der Angabe von Olsen — mit Eindeutigkeit festgestellt werden, daß das Chlorophyll weder den X- noch den V-Faktor zu ersetzen vermag; die Züchtung der obligat haemoglobinophilen Bakterien war auf Chlorophyllagar in keinem Fall möglich, gleichgültig, ob dem Agar im einen Fall V-Faktor, im andern X-Faktor (Haemin) zugesetzt wurde (vgl. Tab. V; Versuchsserie A, B und G).

Von größerem Interesse war nun aber die Feststellung, daß das Wachstum von haemoglobinophilen Bakterien auf Nährböden, die X- und V-Faktor enthalten, nämlich auf Vollblut- und Haemoglobinagar, durch höhere Chlorophyllkonzentrationen nicht nur nicht gehemmt, sondern ganz beträchtlich gesteigert wird (vgl. Versuchsserie D und F). Die durch Chlorophyll bedingte wachstumsfördernde Wirkung zeigte sich hierbei nicht nur in einer größern Keimdichte, sondern vor allem im Auftreten von Riesenkolonien. Daß dem Chlorophyll die Eigenschaften eines accessorischen Wuchsstoffes zukommen, war besonders deutlich auf den Serumagarnährböden, die wohl nur Spuren von X- und V-Faktor enthielten, zu erkennen. Während die streng haemoglobinophilen Influenzabacillen auf diesen Nährböden ohne Chlorophyll bzw. bei kleinern Chlorophyllkonzentrationen nur höchst kümmerlich gediehen, bewirkten höhere Chlorophyllkonzentrationen (0,5—1,0%) ein nahezu optimales Wachstum (vgl. Versuchsserie J). Eine entwicklungshemmende Wirkung von Chlorophyll wurde dagegen auf Levinthal- und besonders auf Haeminagar beobachtet (vgl. Versuchsserie C und H). Da diese Nährböden

arm bzw. frei an Eiweiß sind, war dieser Befund — nach den früheren Versuchen mit nichthaemoglobinophilen Bakterien (vgl. Tab. IV) — zu erwarten. Es wurde daher versucht, den bakteriostatischen Effekt von Chlorophyll durch den Zusatz von Eiweiß — in Form von Ascitesflüssigkeit — auch auf diesen Nährböden aufzuheben. Zu diesem Zweck wurden abgestufte Mengen von Chlorophyll Agarplatten,

Tabelle V. Einfluß von Chloroph

Nährboden	A Agar						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 2	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 3	—	—	—	—	—		
B.parainfluenzae	—	—	—	—	—	—	
Nährboden	**C Levinthalagar**						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
B.influenzae St. 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
B.influenzae St. 3	+++	+++	+++	+++	—	—	
B.parainfluenzae	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Nährboden	**E Agar + Haemoglobin**						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	+	++	++	++	++	++	
B.influenzae St. 2	+	++	++	++	++	++	
B.influenzae St. 3	+	+	+	++	++	++	
B.parainfluenzae	++	++	++	+++	+++	++	

die Ascitesflüssigkeit, Haemin und V-Faktor enthielten, zugesetzt. Als Kontrollen dienten Agarplatten, die im einen Fall einen Zusatz von Ascites, im andern von Ascites + V-Faktor bzw. Haemin erhielten. Sämtliche dieser Nährböden wurden mit 5 typischen Influenzabacillenstämmen bzw. mit 1 Stamm von B.parainfluenzae beimpft.

Wie aus den Versuchsserien L, M und N hervorgeht,

f haemoglobinophile Bakterien.

		B Agar + V-Faktor								
5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
-	—	—	—	—	-	—	—	—	—	—
-	—	—	—	—	—	—	—	-	-	—
-	—	-	-	—	—	—	—	-	-	—
-	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++
		D Agar + Vollblut								
5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
+	—	++	++	++	++	++	++	+++	++++	++++
+	—	++	++	++	++	++	++	+++	++++	++++
-	—	++	++	++	++	++	+++	+++	++++	++++
+	++	++	++	++	++	++	++	+++	++++	++++
		F Agar + Haemoglobin + V-Faktor								
5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
+	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++
+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++
+	—	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
+	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

Nährboden	G Agar + Haemin						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 2	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 3	—	—	—	—	—	—	
B.parainfluenzae	—	—	—	—	—	—	
Nährboden	I Agar + Serum						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
B.influenzae St. 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
B.influenzae St. 3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
B.parainfluenzae	++	+	+	(+)	(+)	(+)	
Nährboden	L Agar + Ascites						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	-	—	—		—	—	
B.influenzae St. 2	—	—	-	-		—	
B.influenzae St. 3	—	—	—			-	
B.influenzae St. 8	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 12	—	—	—	—	—	—	
B.parainfluenzae	-	—	—	—	-	—	
Nährboden	N Agar + Ascites + V-Faktor						
Chlorophyllkonzentration %	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	
B.influenzae St. 1	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 2	—	—		-	—	—	
B.influenzae St. 3	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 8	—	—	—	—	—	—	
B.influenzae St. 12	—	—	—	—	—	—	
B.parainfluenzae	—	—	—	—	—	—	

H Agar + Haemin + V-Faktor

5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
-	—	++	++	++	++	+	+	+		-
-	—	++	++	++	++	+	+	+	—	—
-	—	+++	+++	++	+	(+)	(+)	(+)	—	—
-	—	++	++	++	++	++	++	++	++	+++

K Agar + Serum + V-Faktor

5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
-)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
-	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+++

M Agar + Ascites + Haemin

5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
-	—	—	—	—	—	—	—		—	—
-	—	—	—	—	—		—	—	—	—
-	—	—	—	-	—	—	—	—	—	—
-	—	—	—	—	—	—	—	-	—	—
-	—	—	—	—	—	—	—			—
-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

O Agar + Ascites + Haemin + V-Faktor

5	1,0	0	0,005	0,01	0,02	0,08	0,1	0,2	0,5	1,0
-	—	—	—	—	(+)	—	—	—	-	—
-	—	—	—	++	+	+	+	+	+	(+)
-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
-	—	—	—	—	—	—	—	—	-	—
-	—	—	—	++	++	+++	+++	+++	+++	
-	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

konnte auf den Nährböden, die nur Ascitesflüssigkeit oder Ascites und nur einen der beiden Wachstumsfaktoren enthielten, überhaupt kein Wachstum erzielt werden, ein Hinweis dafür, daß die verwendete Ascitesflüssigkeit wohl weder X- noch V-Faktor enthielt. Auffallend war lediglich, daß der Parainfluenzastamm auch in Gegenwart von V-Faktor kein Wachstum zeigte; dieser Befund konnte nun aber in Versuchen, in denen nachgewiesen wurde, daß der V-Faktor in Gegenwart größerer Mengen von Ascitesflüssigkeit anscheinend an das Eiweiß adsorbiert und hierdurch inaktiviert wird, hinreichend aufgeklärt werden. Es war demnach zu erwarten, daß auch auf Ascitesagar, dem beide Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden (vgl. Versuchsserie O) kein Keimwachstum erfolgen würde. Tatsächlich war dies auch der Fall bei denjenigen Nährböden dieser Serie, die kein Chlorophyll enthielten. Ueberraschenderweise erwiesen sich nun aber dieselben Nährböden bei einem Chlorophyllgehalt von 0,01—0,5% für zwei der untersuchten Influenzabacillenstämme zur Erzielung eines guten, beim einen Stamm sogar reichlichen Keimwachstums als durchaus geeignet. Wiederum liegt die Annahme nahe, daß das Chlorophyll in eiweißreichen Medien keine bakteriostatische, sondern wachstumsfördernde Wirkung hat. Immerhin besteht — in diesem Fall — auch die Möglichkeit, daß das Keimwachstum nur dadurch begünstigt wird, daß das Chlorophyll den V-Faktor aus seiner Adsorption an Eiweiß verdrängt.

Schließlich wurde untersucht, ob die entwicklungshemmende Wirkung von Chlorophyll auf haemin- und V-faktorhaltigen Nährböden von der Menge des X- bzw. des V-Faktors abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden abgestufte Haeminkonzentrationen (1 : 1000, 1 : 10 000 und 1 : 100 000) mit wechselnden Mengen von V-Faktor (0,1, 0,02 und 0,005 cc pro Agarplatte) versetzt und die hemmende Wirkung

zunehmender Chlorophyllkonzentrationen (0,005—1,0%) auf 5 Stämme von Influenzabacillen (St. 1, 2, 3, 8, 12) und einen Parainfluenzastamm geprüft.

Wie aus Tab. VI ersichtlich ist, erwies sich die eben noch vollständig hemmende Chlorophyllkonzentration ausschließlich nur vom Haemingehalt des Nährbodens abhängig. Bei hohem Haemingehalt des Nährbodens waren zur völligen Entwicklungshemmung weit größere Chlorophyllkonzentrationen notwendig als auf Nährböden, die nur mittlere bzw. kleine Haeminmengen enthielten.

Tabelle VI. Komplett entwicklungshemmende Chlorophyllkonzentration bei wechselndem Haemin- bzw. V-Faktor-Gehalt.

Haemin . . .	1 : 1000			1 : 10 000			1 : 100 000			
V-Faktor . .	0,1	0,02	0,005	0,1	0,02	0,005	0,1	0,02	0,005	
Influenza St. 1	0,5	0,5	0,5	0,01	0,01	0,005	—	—	—	Chlorophyllkonzentration in %
Influenza St. 2	1,0	1,0	1,0	0,08	0,08	0,08	0,01	0,01	0,01	
Influenza St. 3	0,005	0,005	0,005	—	0,005	0,005	—	—	—	
Influenza St. 8	0,01	0,01	0,01	0,005	0,005	—	—	—	—	
Influenza St.12	0,08	0,08	0,08	0,01	0,01	0,01	0,005	0,005	—	
Parainfluenza .	>1,0	>1,0	>1,0	0,5	1,0	1,0	0,08	0,08	0,08	

— bedeutet kein Wachstum auch auf chlorophyllfreiem Nährboden

Die Tatsache, daß haemoglobinophile Keime in Gegenwart großer Mengen von Haemin bzw. X-Faktor bedeutend resistenter gegenüber Chlorophyll sind, könnte dahin interpretiert werden, daß der Blutfarbstoff die bakteriostatische Wirkung von Chlorophyll antagonistisch beeinflußt. Eine solche direkte Beziehung zwischen Haemin und Chlorophyll läßt sich nun zwar mit Sicherheit nicht ausschließen, erscheint jedoch wenig wahrscheinlich. Die verhältnis-

mäßig geringe Chlorophyllempfindlichkeit haemoglobinophiler Bakterien auf haeminreichen Nährböden könnte nämlich viel eher auf die — bei reichlichem Angebot von X-Faktor — vermehrte Wachstumspotenz dieser Keime zurückgeführt werden. Zu Gunsten dieser Annahme spricht nun auch die unterschiedliche Chlorophyllempfindlichkeit der verschiedenen Influenzabacillenstämme; so erwiesen sich die Stämme 3 und 8, deren natürlicher Bedarf an X-Faktor anscheinend besonders groß ist, auch bei relativ hohem Haemingehalt (1 : 1000) schon bei kleinsten Chlorophyllkonzentrationen als nicht mehr entwicklungsfähig.

Die Frage, weshalb Chlorophyll auf haemoglobinophile Bakterien nicht nur einen entwicklungshemmenden, sondern gelegentlich auch einen wachstumsbefördernden Effekt ausübt, ist auf Grund der angestellten Versuche kaum zu entscheiden. Daß die Zusammensetzung der Nährböden hierfür ausschlaggebend ist, steht allerdings außer Zweifel; auch ist sichergestellt, daß Chlorophyll nur dann die Eigenschaften eines Wuchsstoffes besitzt, wenn gleichzeitig die obligaten Wachstumsfaktoren*) und ausreichende Mengen von hochmolekularem Eiweiß vorhanden sind. Ob die wachstumsbegünstigende Wirkung von Chlorophyll auf eine «Aktivierung» des X- bzw. V-Faktors zurückzuführen oder von diesen Faktoren weitgehend unabhängig ist, läßt sich zur Zeit ebenfalls nicht entscheiden. Festgestellt wurde lediglich, daß auch Parainfluenzabacillen, die — nach der herrschenden Meinung — nur den V-Faktor benötigen, durch Chlorophyll in der Entwicklung stimuliert werden können. Schließlich bleibt auch die Frage unbeantwortet,

*) Eine Beobachtung ähnlicher Art machte Davis[10]) schon vor Jahren. Nach diesem Autor wird das Wachstum von haemoglobinophilen Bakterien auf Vollblut- bzw. Haemoglobinagar durch den Zusatz pflanzlicher Gewebe (Reis, Weizenmehl, Weizenkleie) ganz erheblich gesteigert.

ob das Chlorophyll selbst oder die ihm adhaerierenden Begleitstoffe den accessorischen Wuchsstoff für haemoglobinophile Bakterien abgeben.

Zusammenfassung.

1. Chlorophyll besitzt ein schwaches bactericides Vermögen gegenüber Keimen, die auch gegenüber sonstigen keimfeindlichen Agenzien besonders labil sind. Resistentere Keime und Sporenbildner werden auch bei tagelanger Einwirkung von großen Chlorophyllkonzentrationen kaum oder überhaupt nicht geschädigt.

2. Die entwicklungshemmende Wirkung von Chlorophyll ist dagegen gegenüber einer Reihe von Bakterien (Strepto-, Pneumo-, Meningococcen, Diphtherie-, Bang-, Milzbrand- und sporulierenden Erdbacillen) auffallend hoch, während andere Keime (Staphylococcen, Typhus-, Dysenteriebacillen, B.perfringens) durch Chlorophyll in ihrer Entwicklung wiederum nicht beeinträchtigt werden.

3. Die bakteriostatische Wirkung von Chlorophyll läßt sich nur auf Nährmedien, die kein hochmolekulares Eiweiß enthalten, nachweisen. Durch den Zusatz von Eiweiß verschiedenster Provenienz (Vollblut, Haemoglobin, Serum, Ascitesflüssigkeit) wird der bakteriostatische Effekt weitgehend aufgehoben.

4. Die obligaten Wachstumsfaktoren (X- und V-Faktor) für haemoglobinophile Bakterien (Influenza-, Parainfluenzabacillen) können durch Chlorophyll nicht substituiert werden. Auf bestimmten, X- und V-Faktor enthaltenden Nährmedien hat dagegen Chlorophyll die Eigenschaften eines accessorischen Wuchsstoffes.

5. Der Mechanismus der entwicklungshemmenden bzw. fördernden Wirkung von Chlorophyll auf Bakterien konnte nicht näher aufgeklärt werden.

Literatur.

[1]) Bürgi E., «Das Chlorophyll als Pharmakon», Verlag G. Thieme, Leipzig 1932.
Schweiz. med. Wschr. 1937, Nr. 50; 1938, Nr. 18.
Bulletin Soc. Thérap. 1938, Nr. 7.

[2]) Gruskin, Am. J. Surg. Juli 1940.

[3]) Daly, Heller und Schneider, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. **42**, 74 (1939).

[4]) Henderson und Long, Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. **48**, 435 (1941).

[5]) Olsen, Zbl. Bakt. Orig. I, **85**, 12 (1921).

[6]) Bürgi S., Zschr. f. d. ges. exp. Med. 1942 (im Druck).

[7]) Fildes, Brit. J. exp. Path. **2**, 16 (1921).

[8]) Lwoff A., Ann. Inst. Pasteur **61**, 580 (1938).

[9]) Rivers und Bayne-Jones, J. exp. Med. **37**, 131 (1923).

[10]) Davis, J. infect. dis. **21**, 392 (1917);
29, 171 (1921).